



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**WILLIAN MATOS DO NASCIMENTO ANDRADE**

**ESTUDO DO PERFIL GRAXO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E OXIDATIVA DE  
ÓLEOS UTILIZADOS COMO ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS POR TÉCNICAS  
DE RMN**

**JOÃO PESSOA  
2018**

**WILLIAN MATOS DO NASCIMENTO ANDRADE**

**ESTUDO DO PERFIL GRAXO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E OXIDATIVA DE  
ÓLEOS UTILIZADOS COMO ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS POR TÉCNICAS  
DE RMN**

Trabalho Final de Curso apresentado ao  
curso de Engenharia Química da Universidade  
Federal da Paraíba como requisito parcial para a  
obtenção do título de bacharel.

Prof. Orientador: Alfredo Ismael Curbelo  
Garnica

JOÃO PESSOA

2018

Catálogo na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação

A553e Andrade, Willian Matos do Nascimento.

ESTUDO DO PERFIL GRAXO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E  
OXIDATIVA DE ÓLEOS UTILIZADOS COMO ALIMENTOS  
NUTRACÊUTICOS POR TÉCNICAS DE RMN / Willian Matos do  
Nascimento Andrade. - João Pessoa, 2018.

36 f. : il.

Orientação: Alfredo Ismael Curbelo Garnica Garnica.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CT.

1. Óleos nutracêuticos Estabilidade termo-oxidativa. I.  
Garnica, Alfredo Ismael Curbelo Garnica. II. Título.

UFPB/BC

**WILLIAN MATOS DO NASCIMENTO ANDRADE**

**ESTUDO DO PERFIL GRAXO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E OXIDATIVA DE  
ÓLEOS UTILIZADOS COMO ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS POR TÉCNICAS  
DE RMN**

Trabalho final de curso submetido à Coordenação Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

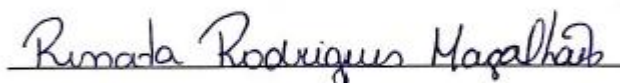
**Aprovado em 18 de junho de 2018.**

**BANCA EXAMINADORA**

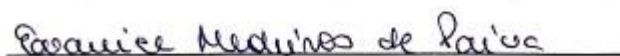
---



Prof(a). Dr(a). Alfredo Ismael Curbelo Garnica



Ma. Renata Rodrigues Guimarães



Ma. Evanice Medeiros de Paiva

## **AGRADECIMENTOS**

A toda a minha família, em especial minha mãe, meu pai e minha irmã, que sempre me apoiaram, fizeram o possível para me apoiar em toda essa jornada.

Aos meus amigos, por estarem sempre por perto, nos momentos tristes, nos mais felizes e que torceram por mim.

Aos meus professores, em especial ao Prof. Alfredo ao Prof. Leopoldo por todas as vezes que me ajudaram dando suporte, correções, por nossas longas conversas em torno da engenharia química e da vida. Os senhores foram exemplo para mim

A PROJEQ por ter me feito enxergar a graduação de uma nova perspectiva, por ter me ensinado a ser mais humano, por me incentivar a entender mais as pessoas, por me ensinar a correr atrás dos meus sonhos, meu muito obrigado.

Ao pessoal do LACOM , por todos os ensinamentos, convívio e o apoio numa etapa fundamental que foi o início.

Ao pessoal do LABMC , por todos os ensinamentos, convívio e carinho.

No mais, a todas as pessoas que de maneira direta ou indireta, contribuíram de forma significativa, meu muito obrigado

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.</b>	<b>Nomeclatura dos Óleos.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.</b>	<b>Ressonância Magnética Nuclear - RMN.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.</b>	<b>Estabilidade Oxidativa .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4.</b>	<b>Índice de Iodo .....</b>	<b>21</b>
<b>3.5.</b>	<b>Índice de Saponificação.....</b>	<b>21</b>
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.</b>	<b>Obtenção dos Óleos.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.</b>	<b>Tratamentos Térmicos.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3.</b>	<b>Obtenção dos Espectros .....</b>	<b>22</b>
<b>4.4.</b>	<b>Equações Utilizadas no Estudo .....</b>	<b>23</b>
<b>4.5.</b>	<b>Estabilidade Oxidativa .....</b>	<b>25</b>
<b>4.6.</b>	<b>Deslocamento Químico.....</b>	<b>25</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1.</b>	<b>Avaliação do Perfil Graxo e Comportamento Termo-Oxidativo do Óleo de Peixe</b>	<b>26</b>
<b>5.2.</b>	<b>Avaliação do Perfil Graxo e Comportamento Termo-Oxidativo do Óleo de Alho.</b>	<b>29</b>
<b>5.3.</b>	<b>Avaliação do Perfil Graxo e Comportamento Termo-Oxidativo do Óleo de Chia</b>	<b>33</b>
<b>5.4.</b>	<b>Caracterização do Óleo de Linhaça.....</b>	<b>35</b>
<b>5.5.</b>	<b>Avaliação do Perfil Graxo e Comportamento Termo-Oxidativo do Óleo de Prímula.....</b>	<b>35</b>

<b>6.</b>	CONCLUSÃO .....	40
<b>7.</b>	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

*“O sábio como astrônomo: Enquanto sentires as estrelas como algo que está por cima de ti não possuis ainda o olhar do homem que sabe.”*

*Friedrich Nietzsche*



## RESUMO

Uma alimentação inadequada pode ser um fator encarrilhador de inúmeros males à saúde humana. Por outro lado, o consumo regular de certos tipos de alimentos pode prevenir ou até mesmo combater alguns tipos de doenças. Os óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) apresentam esta propriedade e fazem parte dos chamados alimentos nutraceuticos. Os óleos de chia (*Salvia hispanica* L.), o óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*), o óleo de prímula (*Oenothera biennis*), óleo de alho (*Allium sativum*) e os óleos de peixes de águas frias são ricos em PUFAS e são consumidos como alimentos nutraceuticos. Por outro lado, o elevado teor de PUFAS presente nestes óleos os torna altamente susceptíveis à degradação termo-oxidativa, processo que altera as propriedades nutricionais e produz substâncias nocivas ao organismo humano. Neste trabalho foi investigada a estabilidade térmica e oxidativa dos óleos de chia, linhaça, prímula e de peixe através da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), uma técnica rápida, de aplicação direta e com resultados altamente reproduzíveis, que permite análises qualitativas e quantitativas do perfil de ácidos graxos dos óleos além da detecção e elucidação de estruturas de produtos da degradação dos óleos. Os óleos foram submetidos a diferentes tratamentos térmicos e o efeito destes tratamentos foram avaliados com relação a composição de ácidos graxos, a variação da massa molecular média e os índices de iodo e de saponificação. Todas as amostras de óleos aquecidas à temperatura de fritura (190 °C) apresentaram degradação dos PUFAS, diminuição do índice de iodo, aumento do índice de saponificação e diminuição da massa molecular média. Nos óleos de chia, de alho e de prímula foram identificadas aldeídos conjugados, indicação de grau elevado de oxidação. No óleo de chia também foi feito um estudo da estabilidade oxidativa empregando o método de Schaal. O resultado mostrou que o óleo de chia apesar de ser a fonte natural mais rica em  $\omega$ -3, permaneceu inalterado durante os 16 dias de armazenamento a 60 °C em estufa com circulação de ar, sugerindo que as condições habituais em que este alimento é armazenado e consumido são seguras.

**PALAVRAS CHAVE:** Óleos nutracêuticos, Estabilidade termo-oxidativa, Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$ RMN)

## ABSTRACT

Inadequate food can be a factor that encroaches upon innumerable diseases in human health. On the other hand, regular consumption of certain types of food can prevent or even combat some types of disease. Oils rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAS) present this property and are part of so-called nutraceutical foods. Chia (*Salvia hispanica* L.) oils, linseed oil (*Linum usitatissimum*), primrose oil (*Oenothera biennis*), garlic oil (*Allium sativum*) and cold water fish oils are rich in PUFAS and are consumed as nutraceutical foods. On the other hand, the high content of PUFAS present in these oils makes them highly susceptible to thermo-oxidative degradation, a process that changes nutritional properties and produces substances that are harmful to the human body. This work investigated the thermal and oxidative stability of chia, linseed, primrose and fish oils through Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR), a fast technique, with direct application and with highly reproducible results, allowing analysis qualitative and quantitative analysis of the fatty acid profile of the oils in addition to the detection and elucidation of product structures of the degradation of the oils. The oils were submitted to different thermal treatments and the effect of these treatments were evaluated in relation to the composition of fatty acids, variation of the average molecular mass and the indices of iodine and saponification. All the samples of oils heated at the frying temperature ( $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) presented degradation of the PUFAS, decrease of the iodine index, increase of the saponification index and decrease of the average molecular mass. In the chia, garlic and primrose oils, conjugated aldehydes were identified, indicating a high degree of oxidation. In the chia oil, a study of oxidative stability was also made using the Schaal method. The result showed that chia oil, despite being the richest natural source in  $\omega$ -3, remained unchanged during the 16 days of storage at  $60^{\circ}\text{C}$  in air circulation greenhouse, suggesting that the usual conditions in which this food is stored and consumed are safe.

**KEYWORDS:** Nutraceutical oils, Thermo-oxidative stability, Nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ RMN)

## INTRODUÇÃO

A complexidade da vida moderna tem causado transformações no cotidiano das pessoas afetando a qualidade de vida e sendo responsável pelo surgimento de males outrora inexistentes (KWAK e JUKES, 2001). À medida que as civilizações vão evoluindo vão surgindo novos hábitos de vida principalmente relacionados com a alimentação. De acordo com estudos a alimentação é um fator que influencia diretamente na saúde e na qualidade de vida dos povos e com o crescimento da expectativa de vida impulsionou a busca por alimentos saudáveis. Neste contexto estão os alimentos nutraceuticos. Estes alimentos apresentam na sua composição compostos químicos como antioxidantes naturais, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), ácido fólico, vitaminas, minerais, fito esteróis e fito estrógenos, que lhes conferem além das propriedades nutricionais básicas presentes nos alimentos comuns, propriedades especiais que atuam regulando as funções do organismo e diminuindo a incidência de doenças como a hipertensão, o câncer, a osteoporose, a obesidade e as doenças cardiopatas (SOUZA, *et al.*, 2003; YAMADA K., *et al.*, 2008).

Os lipídeos ricos em PUFAS ômega-6 e ômega-3 são alimentos nutraceuticos em evidencia no momento. Pertencem a este grupo os óleos de peixe de águas frias (salmão, atum, sardinhas e bacalhau), da semente de chia, de linhaça, de prímula e de alho. O óleo de oliva, embora não tenha uma quantidade de PUFAS expressiva, sua composição rica em antioxidantes naturais, aliada a grande proporção do ácido graxo oleico, um ácido graxo insaturado ômega-9, também é considerado um lipídeo funcional (IXTAINA, *et al.*, 2011).

A oxidação lipídica é um processo inerente aos óleos e gorduras. Os óleos ricos em PUFAS são mais susceptíveis a este processo. A estabilidade de um óleo é a resistência do mesmo a transformações químicas que alteram as propriedades nutricionais e levam ao aparecimento de substâncias tóxicas nocivas ao organismo humano. Estas transformações podem correr através de reações de hidrólise e de oxidação. A avaliação do estado de oxidação de óleos e gorduras é sem dúvida uma medida importante de avaliação da qualidade a nível industrial para garantir a segurança do consumidor (SMOUSE, 1995).

A avaliação da estabilidade oxidativa dos óleos e gorduras pode ser feita em tempo real, onde são aplicados métodos de determinação em tempo real visando estabelecer as condições adequadas de armazenamento e usando testes acelerados,

nos quais o objetivo é prever o tempo de vida útil dos alimentos lipídicos. Existem inconvenientes nas duas vertentes, tempo real e testes acelerados. No primeiro caso os testes de estabilidade consomem muito tempo e no segundo caso as condições drásticas de envelhecimento em que são submetidos os óleos e gorduras nem sempre condizem com os aspectos teóricos em que a oxidação ocorre (ANTONIASSI, 2001; FRANKEL, 1993).

O método oficial usado na determinação da estabilidade oxidativa emprega o equipamento Rancimat da Metrohm. O método se baseia nas variações da condutividade da água deionizada provocadas pela presença de constituintes voláteis derivados da oxidação dos ácidos graxos (AOCS, 2009; ANTONIASSI, 2001). O método avalia satisfatoriamente a estabilidade dos lipídeos, todavia é passivo de algumas interferências, como por exemplo, a presença de constituintes voláteis no óleo, não necessariamente produto de degradação oxidativa.

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) é uma técnica alternativa que vem sendo bastante utilizada na determinação da composição dos ácidos graxos de óleos e gorduras (GUILLÉN e RUIZ, 2001; GUILLÉN e RUIZ, 2003) em substituição ao método oficial, o qual utiliza a técnica Cromatografia Gasosa (CG), adotado como método oficial desde 1992 (SKOOG e LEARY, 1992). A RMN  $^1\text{H}$  é uma técnica rápida, é feita diretamente na amostra sem a necessidade de derivatização como no caso da CG. É uma técnica reprodutível e precisa. Pode ser empregada qualitativamente e quantitativamente na determinação do perfil de ácidos graxos dos óleos e gorduras, podendo também ser utilizada na avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de lipídeos.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade térmica e oxidativa de óleos utilizados como alimentos nutracêuticos empregando a RMN  $^1\text{H}$ .

### Objetivos Específicos

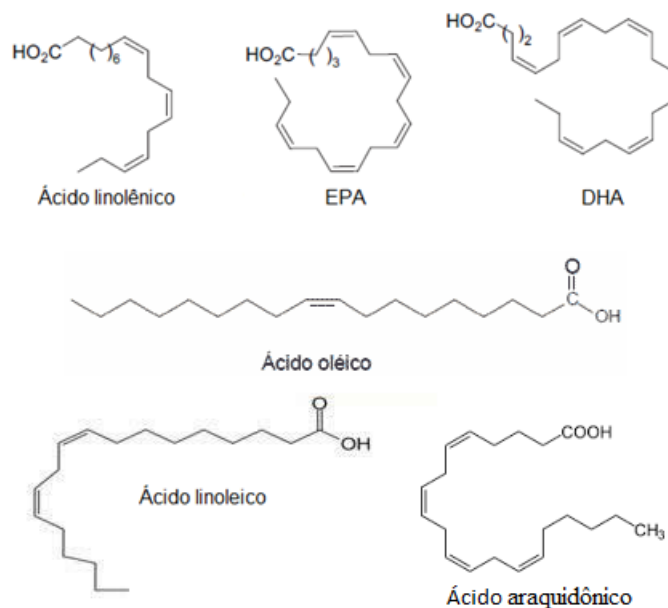
- Obtenção de óleo autêntico de chia extraído através das sementes de *Salvia hispanica* por prensagem;
- Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa dos óleos de chia, linhaça, peixe, alho e pimenta submetido à temperatura de fritura em intervalos de tempos variados;
- Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa do óleo de chia aplicando o teste de Schaal por 16 dias.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### Nomeclatura dos Óleos

A nomenclatura ômega-3 é atribuída aos ácidos graxos que apresentam uma ligação olefínica entre os carbonos 3 e 4 contando a partir do grupo metila terminal da cadeia dos ácidos graxos. São ácidos graxos ômega-3 o ácido  $\alpha$ -linolênico (C18: 3n-3, ALA) encontrado principalmente em óleos vegetais e os ácidos graxos de cadeia longa, o ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3, EPA) e ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA) presentes no óleo de peixe. A estrutura dos ácidos graxos ômega-6 diferem dos ômega-3 por sua vez apresentarem a ligação olefínica entre os carbonos 6 e 7. Pertence a este grupo o ácido linolênico (C18:2n-6, LA) bastante comum em óleos vegetais (MORAES F. P. & COLLA L. M., 2006 ). Os ácidos ômega-3 e ômega-6 são essenciais ao organismo humano e não são produzidos por este, desprovido das enzimas dessaturase  $\Delta 12$  e  $\Delta 15$ , sem as quais não é possível inserir uma dupla ligação na posição ômega-3e ômega-6da cadeia graxa (ADKINS e KELLEY, 2010). A Figura 1 ilustra as estruturas destes ácidos graxos.

Figura 1 - Estruturas dos ácidos graxos mais comuns presentes em óleos e gorduras



Fonte: Elaborada pelo autor

## Ressonância Magnética Nuclear - RMN

A RMN foi inicialmente utilizada no final de 1940 na elucidação de estruturas de compostos orgânicos (GUTOWSKY *et al.*, 1949), e por volta de 1980 tem início a aplicação da técnica na ciência dos alimentos. O desenvolvimento de novos equipamentos tornou possível a aquisição de dados que permitiram o uso da técnica em diversos campos como microbiologia, química dos alimentos e engenharia dos alimentos (BELTON, ENGELSEN e JAKOBSEN, 2005 ; CHEN *et al.*, 2010; NESTOR *et al.* 2010). A RMN <sup>1</sup>H está fundamentada nos níveis de energia quando os núcleos de hidrogênio de uma amostra são excitados sob a influência de um campo magnético externo. Cada núcleo de hidrogênio é cercado por seu elétron e por outros núcleos e nuvens eletrônicas de outros átomos, interferindo no campo externo. A separação dos níveis de energia pode ser muito bem mensurada aplicando a Transformada de Fourier no monitoramento das respostas dos núcleos após terem sido perturbados no seu estado de equilíbrio por um pulso INTENSO DE RADIOFREQUÊNCIA DE RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA (GUILLÉN e RUIZ, 2001; EADS e CROASMUN, 1988).

Figura 2 – Transformada de Fourier



Fonte: Elaborada pelo autor

O espectro de RMN é composto por uma série de sinais de picos, cujas frequências revelam dados a respeito da natureza química dos núcleos de hidrogênios presentes na amostra. A intensidade dos sinais é diretamente proporcional ao número de núcleos de hidrogênio relativos ao mesmo. Matematicamente a integral do sinal permite determinar a quantidade de hidrogênios e assim quantificar os hidrogênios de uma amostra. A partir do valor da integral de cada pico é possível fazer uma correlação entre os mesmos e a determinação de vários parâmetros necessários para a caracterização de óleos e gorduras, tais como índice de iodo, saponificação, teor de  $\omega-3$ , entre outros aspectos (GULLÉN e RUIZ, 2001).

### Estabilidade Oxidativa

O processo de oxidação de lipídios foi extensivamente estudado e revisado FRANKEL (1980, 1991); ANGELO (1996), pois a deterioração oxidativa nos alimentos contendo lipídios é responsável pela formação de sabores estranhos que reduzem a qualidade e a vida-de-prateleira dos mesmos, além de produzir outros compostos com implicações nutricionais indesejáveis (FRANKEL e HUANG, 1994; HAUMANN, 1993).

Entre os fatores que afetam ou catalisam a oxidação dos lipídios, os mais importantes são: presença de insaturação nos ácidos graxos, luz, temperatura, presença de antioxidantes e de pró-oxidantes (como metais e clorofila), enzimas, metaloproteínas, microrganismos e condições de armazenamento (NAWAR, 1985).

A estabilidade oxidativa, parâmetro global para avaliação de qualidade de óleos e gorduras, não depende apenas da composição química, mas reflete também a qualidade da matéria-prima, as condições a que foi submetido o produto durante o processamento e condições de estocagem. SMOUSE (1995) completa que além destes fatores, a estabilidade oxidativa depende também da estocagem da semente

e do óleo, da presença de sabões, de fosfolipídios e de pigmentos no óleo e das condições do processo de desodorização.

A técnica Rancimat, que é atualmente utilizada como padrão para a análise de determinação da estabilidade oxidativa, acelera o processo de envelhecimento da amostra por exposição ao calor e elevado volume de ar, medindo o tempo que decorre até que a oxidação ocorre a uma taxa elevada - o tempo de indução ou índice de estabilidade oxidativa (OSI). Esta máquina necessita de várias horas para a determinação do período de indução das amostras, ao passo que a RMN  $^1\text{H}$  de alta resolução necessita de alguns segundos e é capaz de detectar produtos oriundos da oxidação de óleos e gorduras.

### Índice de Iodo

O índice de iodo é uma estimativa do grau de instauração dos ácidos graxos presentes no óleo. Este indicativo, obtidos pelos métodos clássicos (Wijs e Hanus), é realizado através da adição de iodo à dupla ligação. Já por RMN  $^1\text{H}$  é obtido através de uma equação de que relaciona a integral referente aos hidrogênios alílicos e *bis*-alílicos com a massa molecular média dos ácidos graxos. Esta medida além de auxiliar na estimativa do grau de instauração, auxilia na estimativa da susceptibilidade à degradação oxidativa e uma ideia da viscosidade do óleo.

### Índice de Saponificação

Já o índice de saponificação é o valor em miligramas de KOH (hidróxido de potássio) necessário para saponificar 1g de óleo e gorduras e é um método recomendado pela AOCS (American Oil Chemists' Society ) para caracterizá-los.

Óleos ricos em ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) são considerados como essenciais aos organismos, pois sua ausência pode causar disfunções metabólicas podendo levar até a morte. Nessa perspectiva, os ácidos graxos  $\omega$ -3, com destaque do linolênico presente em grande concentração no óleo de chia, linhaça dentre outros e os ricos em  $\omega$ -6, ressaltando a importância do linoleico neste grupo. Já o óleo de peixe apresenta uma característica específica, a presença de ácidos polinsaturados de cadeias longas, destacando o araquidônico (AA), o eicosapentaenoico (EPA) e o docosaexaenoico (DHA), que são reportados na literatura como responsáveis por várias funções biológicas, tais como composição, atividade fluidodinâmica, integridade estrutural da membrana celular entre uma série de funções.



## METODOLOGIA

### Obtenção dos Óleos

Neste trabalho foram utilizados os óleos de chia autêntico extraído em laboratório a partir das sementes de *Salvia hispanica* por prensagem e óleo comercial de chia. As sementes para a extração do óleo foram adquiridas na cidade de Recife – PE. Os óleos comerciais de chia, peixe, linhaça, alho e prímula foram adquiridos no comércio da cidade de João Pessoa – PB. Todas as amostras depois de adquiridas foram acondicionadas em refrigerador até a realização dos ensaios.

### Tratamentos Térmicos

O óleo da semente de chia foi submetido a avaliação da estabilidade térmica e oxidativa aplicando o teste de Schaal. Para tanto o óleo foi acondicionado em recipiente de vidro transparente e armazenado em estufa à temperatura de 60 °C durante 16 dias com circulação de ar. O recipiente contendo o óleo foi mantido aberto durante este período.

Foram submetidos ao aquecimento na temperatura de fritura, 180 – 190 °C o óleo de chia e os demais óleos em intervalos de tempos variados, Tabela 1. Os óleos foram colocados em um bécher de 50 mL, aquecidos em uma chapa. Para controle da temperatura foi colocado um termômetro em contato direto com o óleo aquecido.

Tabela 1 - Óleos e seus respectivos tempos de submissão ao estresse térmico.

Óleos aquecidos	Tempo de aquecimento (minutos)
Alho	15, 30, 45
Peixe	15, 30, 45, 60
Chia	480
Prímula	60

### Obtenção dos Espectros

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das amostras de óleo antes e após os tratamentos térmicos foram feitos no LABRMN-IQ (Instituto de Química) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As análises foram realizadas em um espectrômetro DRX-300 da Buker 7,05 T (300 MHz). O solvente utilizado na solubilidade foi o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e o tetrametilsilício foi usado como padrão interno de referência. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm). O tempo de aquisição dos espectros foi de 1,778 segundos e para o tratamento dos dados foi utilizado o programa MestreNova.

### Equações Utilizadas no Estudo

Através da integral dos sinais de hidrogênio obtidos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , foram determinados os índices de iodo e de saponificação, além da determinação do perfil dos ácidos graxos com a utilização das equações matemáticas (1) a (4), elaboradas e apresentadas nos trabalhos de Carneiro, Reda & Carneiro (2006), de (5) à (7) propostas por Guillen e Ruiz (2003) e por fim (8) e (9) por Knothe e Kenar (2004).

A massa molecular média do triacilglicerídeo ( $M_w$ ) é calculada a partir da Equação 1:

$$M_w = 119.70 + 7.036T + 5.983V \quad (1)$$

Em que:

T = Total de hidrogênios presentes no espectro.

A integral referente aos hidrogênios alílicos e *bis*-alílicos (V) pode ser calculada pela Equação 2:

$$V = \text{alílicos}/2 + \text{bis- alílicos} \quad (2)$$

O índice de iodo (II) pode ser calculado pela Equação 3:

$$II = (126.91 \times 100V)/M_w \quad (3)$$

O Índice de Saponificação (IS) pode ser calculado pela Equação 3:

$$IS = 0.2358Mw + 398.42 \quad (4)$$

A proporção de  $\alpha$ -Linolênico (Ln), Linoleico (L) e Oleico (O) pode ser calculado pelas Equações (5), (6) e (7), respectivamente:

$$Ln(\%) = 100[B/(A+B)] \quad (5)$$

$$L(\%) = 100[(E/D) - 2[B/(A+B)]] \quad (6)$$

$$O(\%) = 100[(C/2D) - (E/D) + [B/(A+B)]] \quad (7)$$

Em que:

A = área do sinal dos hidrogênios do grupo metila terminal para saturados, oleico e linoleico.

B = área do sinal do grupo metila dos hidrogênios do grupo metila do linolênico.

C = área do sinal do grupo metila dos hidrogênios metilenos na posição  $\alpha$ , em relação à ligação dupla (prótons alílicos).

D = área do sinal do grupo metila dos hidrogênios metilenos na posição  $\alpha$ , em relação à carbonila.

E = área do sinal do grupo metila dos hidrogênios metilenos na posição  $\alpha$ , com respeito à duas ligações duplas (prótons *bis*-alílicos).

A porcentagem molar de ácidos graxos insaturados (INS%) pode ser calculado pela equação (8):

$$INS\% = Ln(\%) + L(\%) + O(\%) \quad (8)$$

A porcentagem molar de ácidos graxos saturados (SAT%) pode ser calculado pela equação (8):

$$\text{SAT\%} = 100 - \text{INS\%} \quad (9)$$

### Estabilidade Oxidativa

Com o objetivo de detectar produtos oriundos da oxidação dos óleos nutracêuticos, foram analisadas as regiões do espectro características destes compostos com maior atenção, visando uma análise qualitativa.

### Deslocamento Químico

Tabela 2 - Sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos óleos e dos produtos da oxidação.

Deslocamento químico (ppm) $^1\text{H}$	Compostos / Grupo funcional	Referências
0,83 – 0,93	$-\text{CH}_3$ (cadeias metílicas terminais de saturados, oleico e linoleico)	(GUILLÉN e RUIZ, 2003)
0,93 – 1,03	$-\text{CH}_3$ (cadeias metílicas terminais de linolênico)	(GUILLÉN e RUIZ, 2003)
1,22 – 1,42	$-(\text{CH}_2)_n-$ (cadeias metílicas)	(GUILLÉN e RUIZ, 2003)
1,52 – 1,70	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (metilenos $\beta$ à carbonila)	(GUILLÉN e RUIZ, 2003)
1,94 – 2,14	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ (prótons alílicos)	(GUILLÉN e RUIZ, 2003)
2,23 – 2,36	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$ (hidrogênios metilenos na posição $\alpha$ , em relação à carbonila)	(GUILLÉN e RUIZ, 2003)

2,38	-OCO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - (grupos acils do ácido docosahexanóico DHA)	AURSAND <i>et al.</i> (1993)
2,70 – 2,84	=CH- CH <sub>2</sub> -CH= (prótons <i>bis</i> -alílicos)	((GUILLÉN e RUIZ, 2003)
4,10 – 4,32	-CH <sub>2</sub> OCOR ( prótons do glicerol)	(GUILLÉN e RUIZ, 2003)
5,20 – 5,26	>CHOCOR (prótons do glicerol)	(GUILLÉN e RUIZ, 2003)
5,26 – 5,40	-CH=CH- ( hidrogênios olefínicos )	(GUILLÉN e RUIZ, 2003)
9,48; 9,50	trans-2-alquenals / – CHO (grupo aldeídos)	CIAXON <i>et al.</i> (1994); HAYWOOD <i>et al.</i> (1995); HEATON <i>et al.</i> (2012)
9,52	Alca-2,4-dienals / –CHO (grupo aldeídos)	CIAXON <i>et al.</i> (1994); HAYWOOD <i>et al.</i> (1995);
9,63	4-hidroxi-trans-2-alquenals / –CHO (grupo aldeídos)	HAYWOOD <i>et al.</i> (1995)
9,77	–CHO (aldeídos saturados)	HEATON <i>et al.</i> (2012)

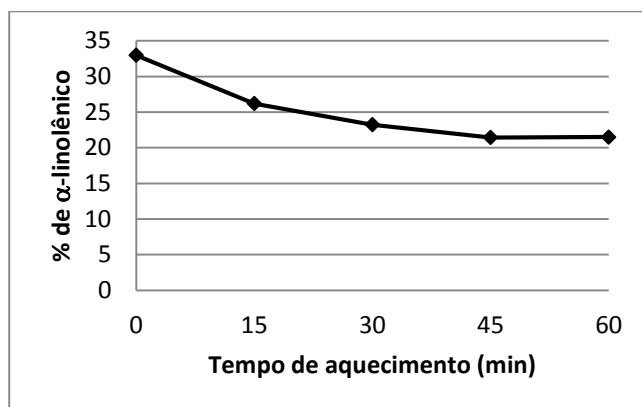
---

## RESULTADOS

### Avaliação do Perfil Graxo e Comportamento Termo-Oxidativo do Óleo de Peixe

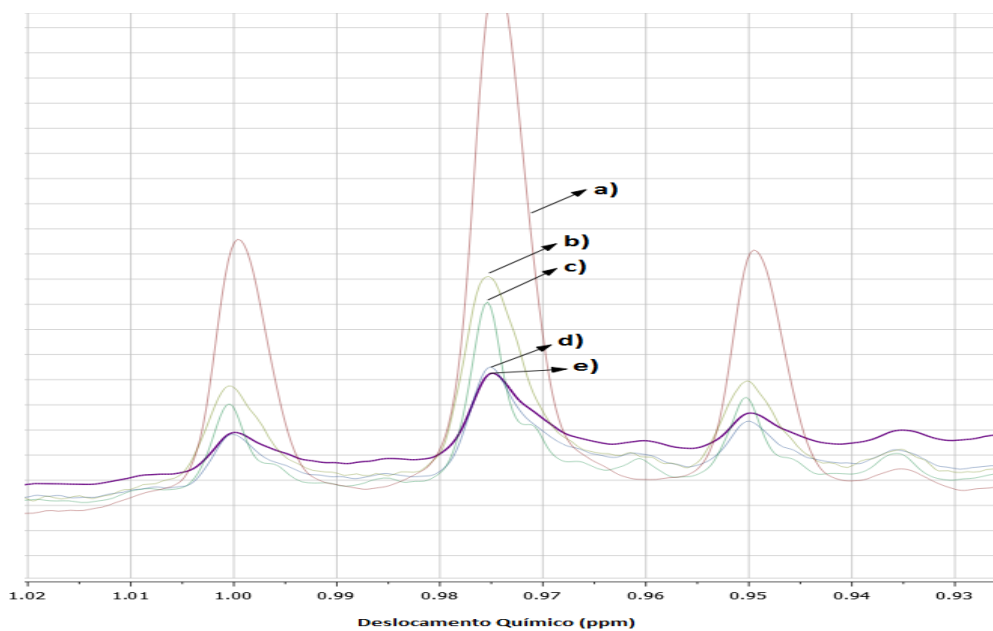
O óleo de peixe, submetido ao aquecimento em temperatura de fritura, apresentou um acentuado decaimento na proporção do ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3;  $\omega$ -3) nos primeiros 30 minutos de aquecimento, seguido de uma queda mais suave nos 30 minutos seguintes, como é possível observar na Fig. 3:

Figura 3 - Concentração de  $\alpha$ -linolênico no óleo de peixe durante 60 minutos de aquecimento à temperatura de fritura.



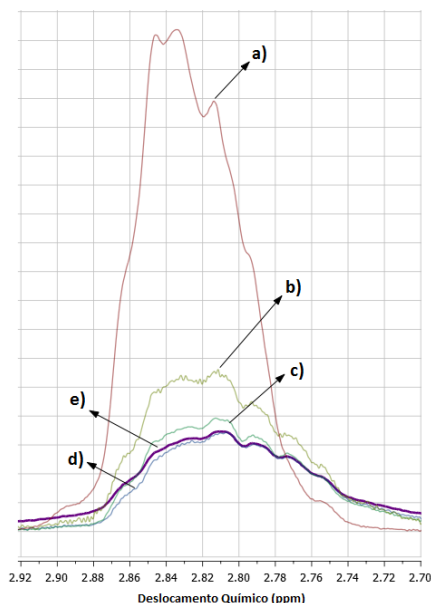
Em seguida, nota-se o decaimento do pico característico do  $\alpha$ -linolênico, ainda referente ao aquecimento do óleo de peixe:

Figura 4 - Decaimento da intensidade do sinal característico do  $\alpha$ -linolênico (0,93 – 1,03ppm) durante o aquecimento, sendo a curva (a) referente ao óleo sem ser aquecimento, (b) após 15 min, (c) 30 min, (d) 45 min e (e) 60 min de aquecimento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5 - Decaimento da intensidade do sinal referente aos hidrogênios *bis*-alílicos (2,70 – 2,84), sendo a curva (a) referente ao óleo sem ser aquecimento, (b) após 15 min, (c) 30 min, (d) 45 min e (e) 60 min de aquecimento.

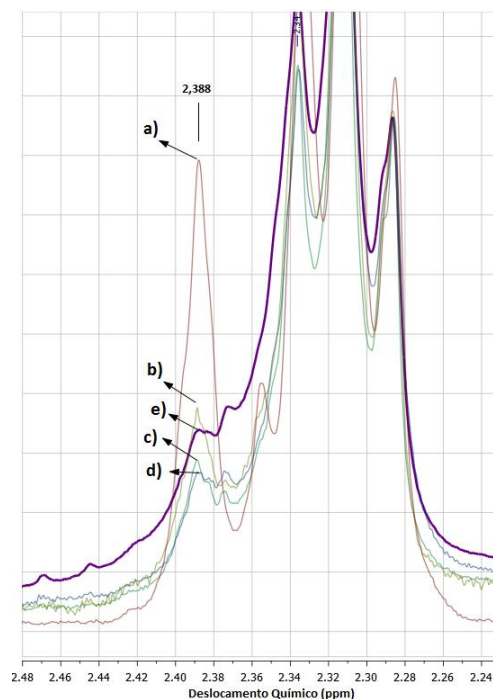


Fonte: Elaborada pelo autor.

É importante observar a diminuição brusca no número de hidrogênios *bis*-alílicos nos 15 primeiros minutos de aquecimento, seguida de consecutivas baixas. Como é citado na literatura, vários mecanismos de reações de oxidação existentes nesse próton, ratificando a grande susceptibilidade à oxidação deste óleo.

Ainda referente ao óleo de peixe, foi realizada uma sobreposição dos espectros referentes a cada tempo de aquecimento e observar uma diminuição considerável da intensidade do pico que diz respeito ao ácido docosahexanóico (DHA) em 2,38 ppm citado por Aursand *et al.* (1993). Como se observa na imagem seguinte:

Figura 6 - Decaimento da intensidade do sinal referente aos hidrogênios -OCO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- do ácido docosahexanóico (DHA), sendo a curva (a) referente ao óleo sem ser aquecimento, (b) após 15 min, (c) 30 min, (d) 45 min e (e) 60 min de aquecimento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

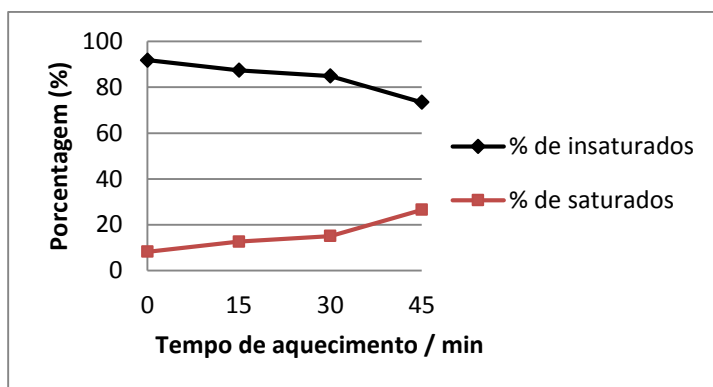
Mesmo tendo sido observadas várias características da degradação do óleo, não foi possível identificar no espectro a presença dos picos referentes aos compostos da oxidação na região de 9,00 – 10,00 ppm.

#### ■ Avaliação do Perfil Graxo e Comportamento Termo-Oxidativo do Óleo de Alho.

O óleo de alho, foi submetido à temperatura de 180 – 190°C (fritura), apresentando um acentuado declínio na proporção dos ácidos graxos insaturados (C18:3; C18:2 e C18:1) e as equações, como consequência, apresentaram um aumento dos níveis de ácidos saturados. Como podemos observar na Figura7 a seguir:

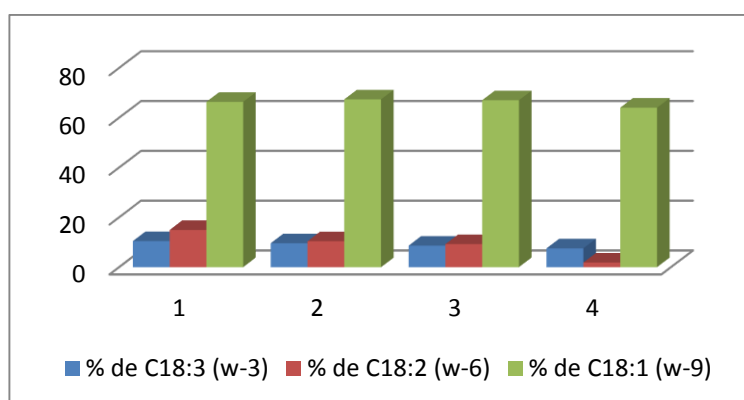
Figura 7 - Proporções de ácidos graxos saturados e insaturados durante 45 minutos de aquecimento





Através das Equação (5), (6) e (7), também foi possível calcular as porcentagens de cada ácido graxo insaturados para os tempos de 15, 30 e 45 minutos.

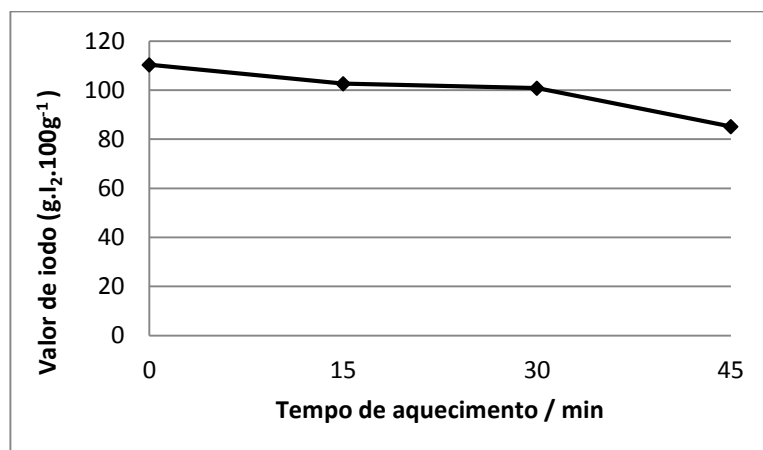
Figura 8 - Porcentagens de ácidos graxos insaturados presentes no óleo de alho durante 45 minutos de aquecimento.



Na qual 1 é o perfil de ácidos graxos insaturados antes do aquecimento, 2 é com 15 min, 3 com 30 min e 4 com 45 minutos de aquecimento.

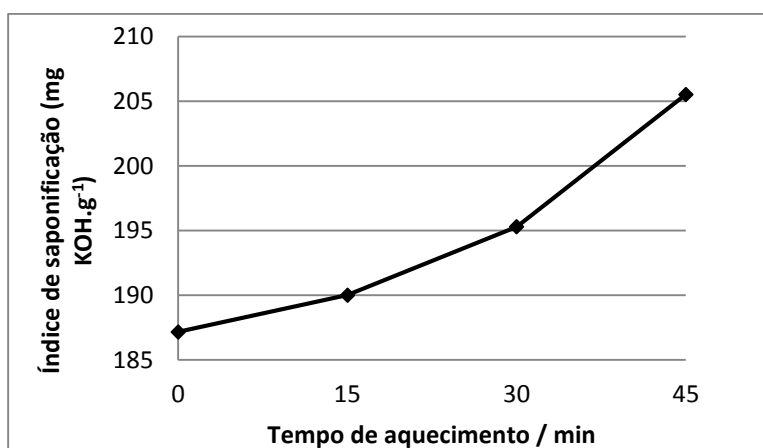
O cálculo do índice de iodo também foi calculado para o óleo de alho Figura 9, através da Equação 3. Observou-se um decaimento do índice de iodo, indicando uma queda no número de insaturações durante o aquecimento. Este resultado está de acordo com os dados obtidos nas Figuras 7 e 8, que demonstram a diminuição dos teores de ácidos graxos insaturados e na Figura 7 o aumento gradual de ácidos saturados.

Figura 9 - Valores de iodo para o óleo de alho, durante 45 minutos de aquecimento em temperatura de fritura.



Também foi calculado o índice de saponificação, que se trata da quantidade de KOH expressa em miligramas que é necessária para saponificar um grama (mil miligramas) de óleo, para as amostras de óleo de alho aquecidas, onde um aumento, cada vez maior, do índice de saponificação foi observado.

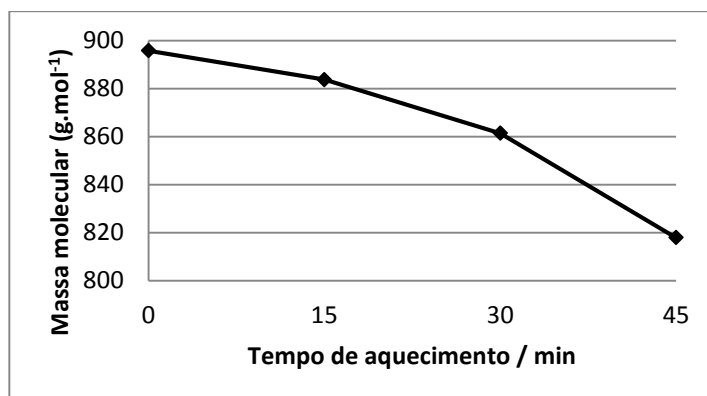
Figura 10 - Valores do índice de saponificação para o óleo de alho, durante 45 minutos de aquecimento em temperatura de fritura.



Durante os 45 minutos de aquecimento do óleo de alho, foi observado um gradual declínio da sua massa molecular média. Como o procedimento foi realizado em um béquer aberto, essa perda de massa deve-se a perda de compostos voláteis,

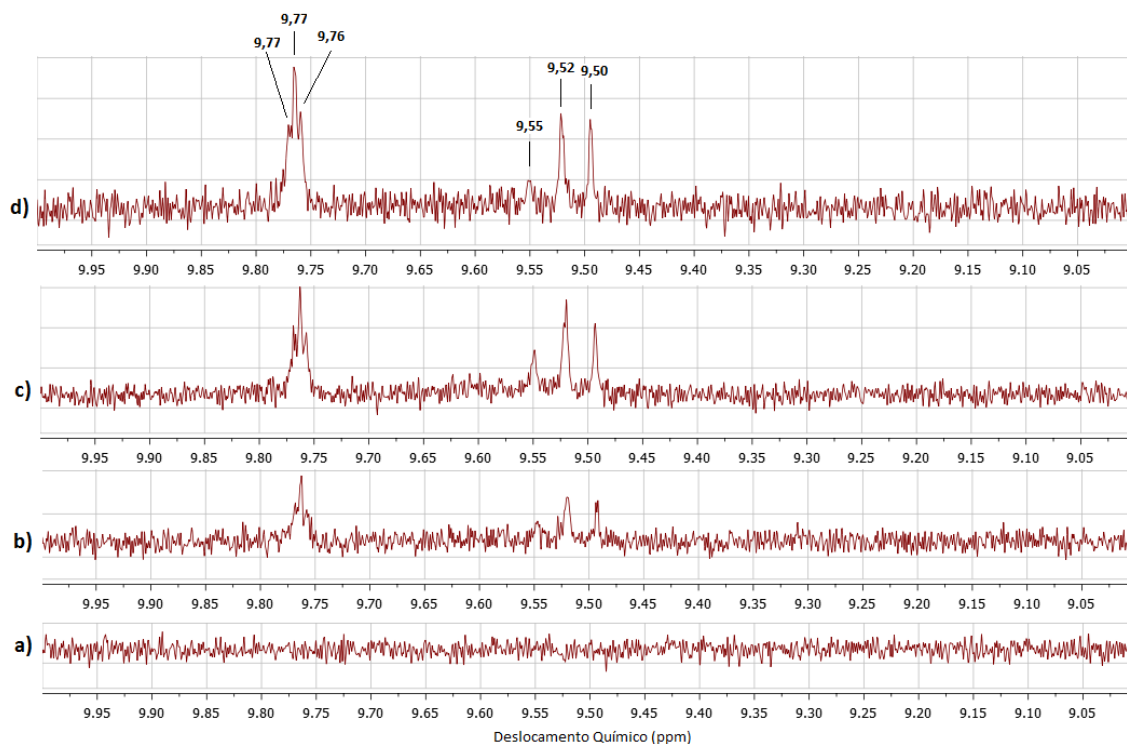
volatilizados durante o aquecimento da amostra. Observa-se este fato com o auxílio da Figura 11.

Figura 11 - Valores da massa molecular média para o óleo de alho, durante 45 minutos de aquecimento em temperatura de fritura.



Além de todos os parâmetros comentados anteriormente, analisamos cuidadosamente o espectro na região entre 9,00 – 10,00 ppm, tomando cuidado em manter a razão sinal-ruído constante e foi verificada a presença de compostos oriundos da oxidação secundária tais como trans-2-alquenais encontrados na região de 9,48; 9,50 ppm CLAXON *et al.*(1994), alca-2,4-dienais na região de 9,52 ppm, citados por Claxon *et al.*(1994) e Haywood *et al.*(1995) e aldeídos de cadeia saturadas na região de 9,77 ppm, mencionados no trabalhos de Heaton *et al.* (2012). Apresentando em comum o grupo funcional –CHO.

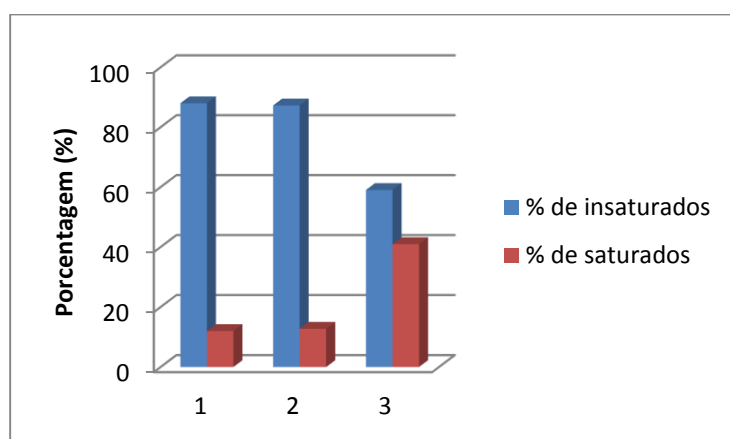
Figura 12 - Aumento da intensidade dos picos oriundos da oxidação secundária do óleo de alho, onde a curva (a) é o espectro referente ao óleo sem ser aquecimento, (b) faz referência aos espectros com 15, (c) 30 e (d) 60 minutos de aquecimento.



### ■ Avaliação do Perfil Graxo e Comportamento Termo-Oxidativo do Óleo de Chia

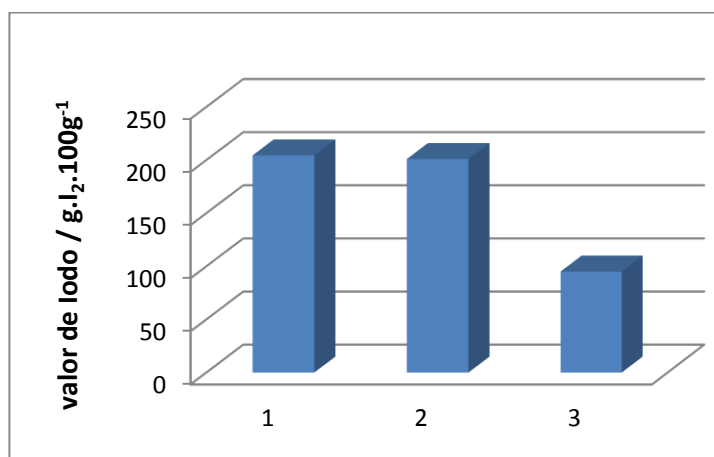
O óleo de chia, que é o alimento com maior teor de  $\omega$ -3 conhecido, foi submetido não só ao tratamento térmico em estufa (tratamento de Schaal), mas também à temperatura de fritura por 8 horas.

Figura 13 - Proporções de ácidos graxos saturados e insaturados antes do aquecimento, no teste de Schaal e durante 8 horas de aquecimento onde (1) é o óleo de chia sem aquecimento, (2) tratamento em estufa por 16 dias em temperatura de 60°C e (3) em temperatura de fritura (190°C) por 8 horas.



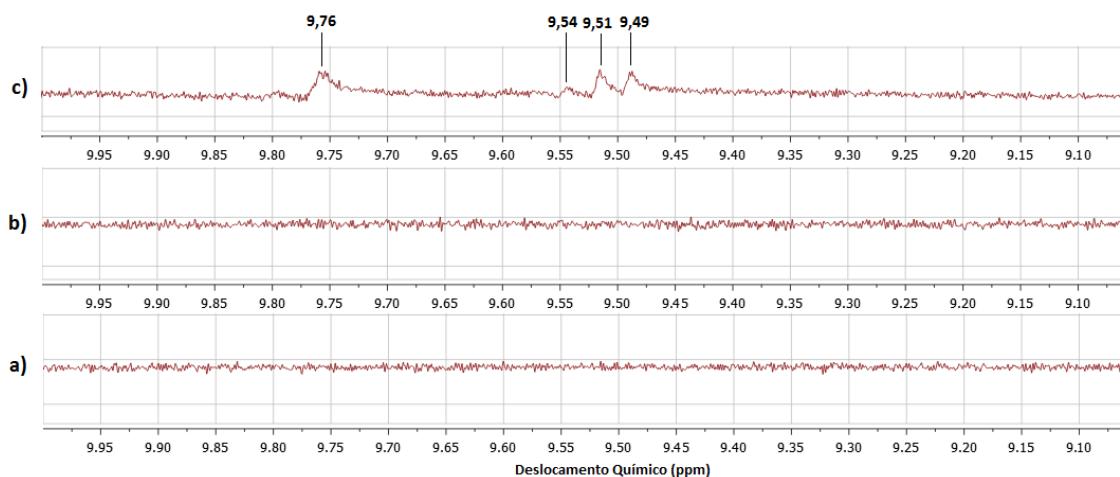
Em concordância com o decaimento do teor dos ácidos graxos insaturados do óleo de chia, observamos uma queda significativa do índice de iodo. Enquanto o teste de Schaal acarretou numa pequena queda dos níveis de insaturados o tratamento térmico, em temperatura de fritura, por oito horas, acarretou numa queda substancial do índice de iodo, como observados na Figura 14 abaixo:

Figura 14 - Índice de iodo do óleo de chia sem aquecimento, no teste de Schaal e durante 8 horas de aquecimento, onde (1) é o óleo de chia sem aquecimento, (2) em estufa por 16 dias em temperatura de 60°C e (3) em temperatura de fritura (190°C) por 8 horas .



Assim como para o óleo de alho, foi possível detectar produtos oriundos da oxidação secundária dos ácidos graxos no óleo de chia. Na Figura 15 ( com a razão sinal-ruído mantida constante), para o óleo submetido à temperatura de fritura (190°C) por 8 horas, foi notada a presença de aldeídos com picos com grande proximidade aos citados a seguir, tais como o trans-2-alquenais encontrados na região de 9,48; 9,50 ppm (CIAXON *et al.* 1994), alca-2,4-dienais na região de 9,52 ppm, citados por (CIAXON *et al.* 1994) e (HAYWOOD *et al.* 1995) e aldeídos de cadeia saturadas na região de 9,77 ppm, mencionados no trabalhos de (HEATON *et al.* 2012). Apresentando em comum o grupo funcional –CHO. Já para o óleo sem aquecimento e o que passou pelo teste de Schaal não foi notada a presença destes compostos.

Figura 15 - Picos oriundos da oxidação secundária do óleo de chia, onde (a) é o óleo de Chia em tempo 0, (b) depois de 16 dias em estufa à 60°C e (c) por 8h em temperatura de fritura (190°C).



### Caracterização do Óleo de Linhaça

Por não ter sido possível adquirir o óleo de linhaça em quantidade suficiente para realizar o tratamento térmico do óleo de linhaça, conseguiu-se apenas realizar a sua caracterização de acordo com a Tabela 3 em suas condições normais.

Tabela 3 - Parâmetros do óleo de linhaça.

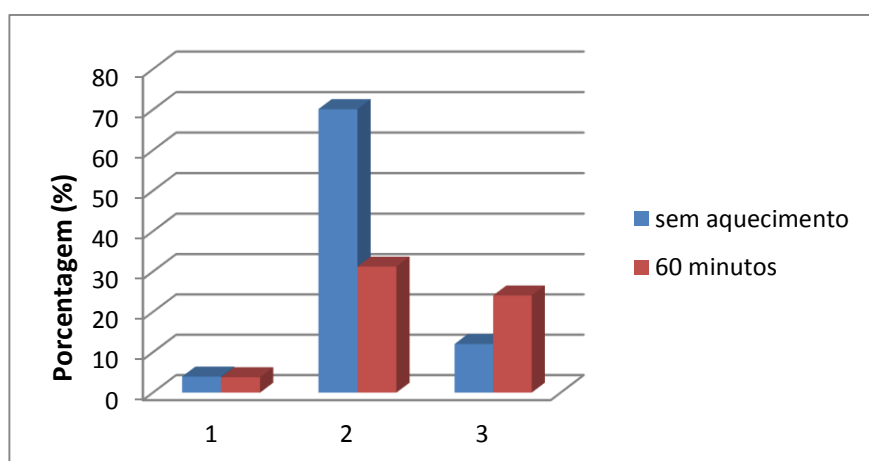
Massa molecular média (g.mol <sup>-1</sup> )	890,472
Índice de iodo (g.I <sub>2</sub> .100g <sup>-1</sup> )	174,088
Índice de saponificação (mg.KOH.g <sup>-1</sup> )	188,446
Teor de linolênico (%)	49,12
Teor de linoleico (%)	11,71
Teor de oleico (%)	28,78
Teor de insaturados (%)	89,63
Teor de saturados (%)	10,37

### Avaliação do Perfil Graxo e Comportamento Termo-Oxidativo do Óleo de Prímula

O óleo de prímula foi estudado sem aquecimento por não ter sido possível adquirir o óleo de prímula no mercado paraibano em quantidade suficiente para realizar o tratamento térmico do óleo e submetido, por 60 minutos, à temperatura de fritura (180-190°C) em um béquer, sobre uma chapa de aquecimento e com o controle térmico realizado com termômetro.

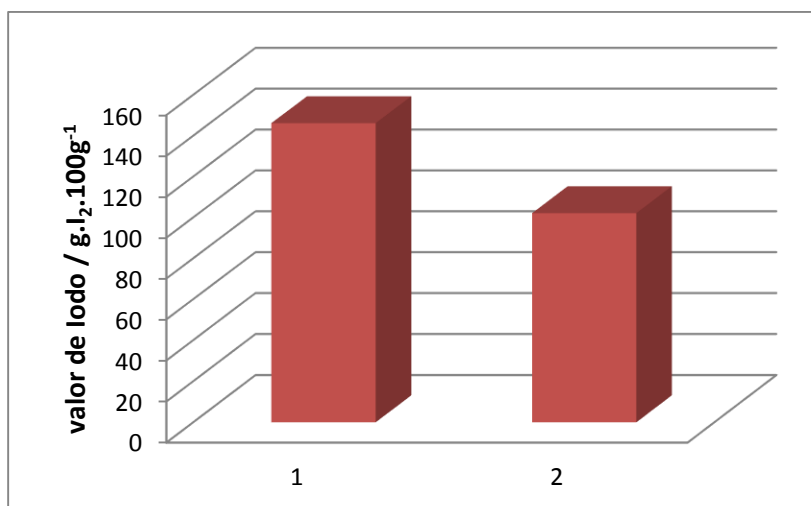
De forma análoga aos óleos estudados anteriormente, um comportamento semelhante na diminuição dos teores de ácidos graxos insaturados, da massa molecular média, do índice de iodo e um aumento no índice de saponificação ficou bem claro.

Figura 16 - Teores de ácidos graxos insaturados do óleo de prímula sem aquecimento e depois de 60 minutos em temperatura de fritura, onde (1) é o teor de C18:3 ( $\omega$ -3), (2) é o teor de C18:2 ( $\omega$ -6) e (3) o teor de C18:1 ( $\omega$ -9).



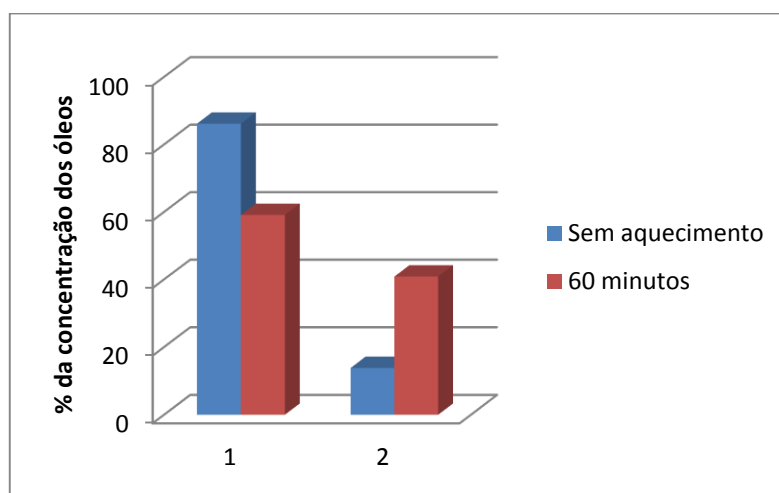
Em concordância com o decaimento dos valores dos ácidos graxos insaturados, é observada a queda do índice de iodo para a amostra submetida ao aquecimento por 60 minutos, demonstrada na fig. 17 abaixo:

Figura 17 - Índice de iodo do óleo de prímula sem aquecimento e depois de 60 minutos em temperatura de fritura, onde (1) é o óleo antes do aquecimento e (2) após 60 minutos de aquecimento.



A diminuição do teor de ácidos graxos insaturados e o consequente aumento no teor de saturados também ficaram evidenciados. Este perfil pode ser facilmente observado com o auxílio da fig. 18, apresentada a seguir:

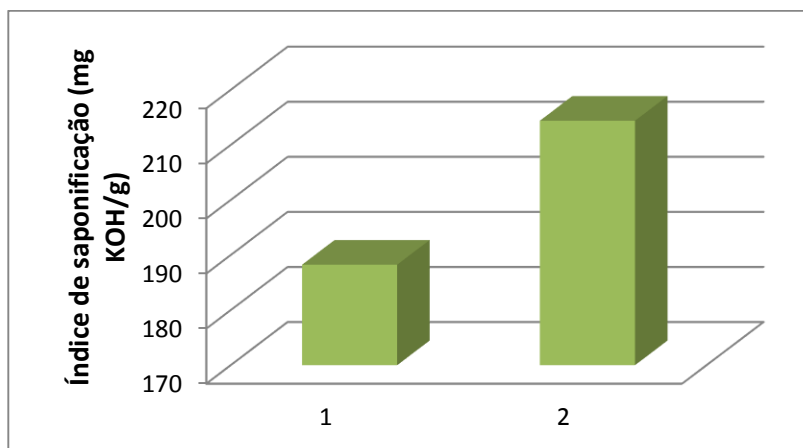
Figura 18 - Proporções de ácidos graxos saturados e insaturados antes do aquecimento e após 60 minutos em temperatura de fritura, onde (1) é o óleo antes do aquecimento e (2) após 60 minutos de aquecimento.



Após o tratamento térmico, o óleo também apresentou uma alta considerável no índice de saponificação, como podemos observar na Figura 19:

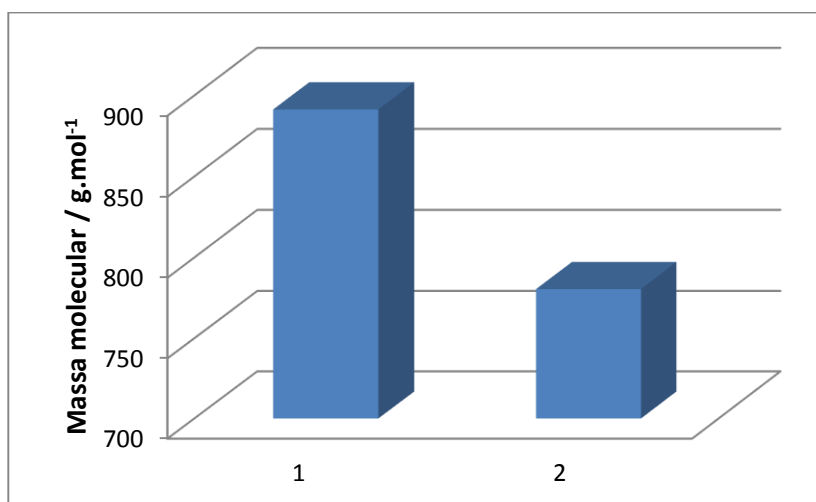


Figura 19 - Índice de saponificação antes do aquecimento e após 60 minutos decorridos em temperatura de fritura, onde (1) é o óleo antes do aquecimento e (2) após 60 minutos de aquecimento.



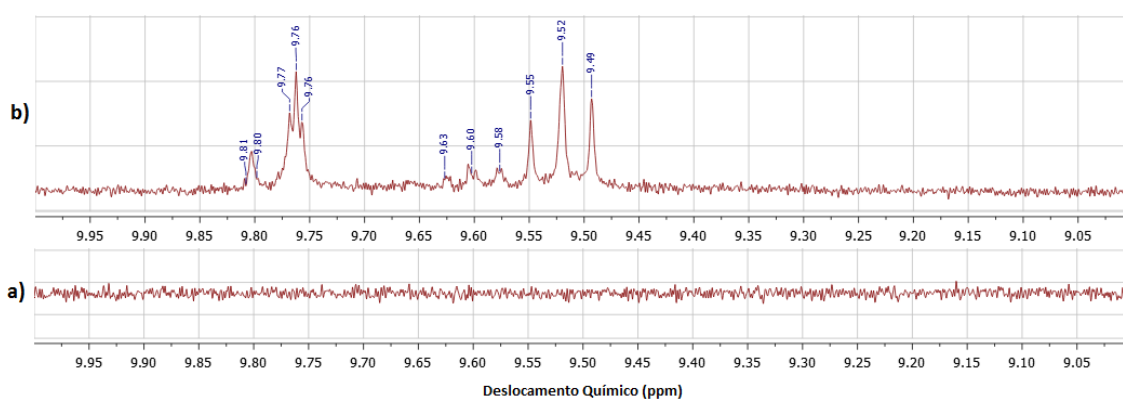
Como foi submetido ao estresse térmico, em alta temperatura e por um tempo considerável, o óleo apresentou uma perda de massa molecular bastante pronunciada. Podemos explicar esta perda de peso pela volatilização de compostos voláteis, gerados durante o aquecimento.

Figura 20 - Valores da massa molecular média para o óleo de prímula antes e após 60 minutos de aquecimento em temperatura de fritura, onde (1) é o óleo antes do aquecimento e (2) após 60 minutos de aquecimento.



Com uma análise dos espectros na região de 10,0 – 9,0 ppm, mantida a razão sinal-ruído constante) foram observados picos bastante pronunciados de compostos oriundos da oxidação secundária do óleo (mostrados da Imagem 5). Foram notados picos de aldeídos tais como o trans-2-alquenais encontrados na região de 9,48; 9,50 ppm (CIAXON et al.1994), alca-2,4-dienais na região de 9,52 ppm, citados por Ciaxon *et al.*(1994) e Haywood *et al.*(1995) e aldeídos de cadeia saturadas na região de 9,77 ppm, mencionados no trabalhos de Heaton *et al.* (2012), além 4 outros picos na região de 9,58 -9,63ppm e 9,8 ppm oriundos de outros aldeídos. Apresentando em comum o grupo funcional –COH.

Figura 21 - Picos oriundos da oxidação secundária do óleo de prímula, onde (a) é o óleo de prímula em tempo 0, (b) depois de 60 minutos temperatura de fritura (190°C)



## CONCLUSÃO

A ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) se mostrou uma técnica eficaz e prática para obtenção de vários parâmetros necessários para a caracterização de óleos nutracêuticos. Com o auxílio de ferramentas matemáticas, como as equações, é possível obter vários parâmetros de fundamental importância para a indústria de alimentos, tais como o grau de insaturação, percentuais dos principais ácidos insaturados presentes, além do índice de saponificação e massa molecular média. Por se uma técnica que não se faz necessário uma preparação das amostras antes da análise e requerer pouco tempo de análise, foi possível analisar várias mostras em um curto período de tempo. Também o perfil graxo dos óleos e identificar a presença de compostos tóxicos à saúde humana oriundos do processo de oxidação secundária.

Conseguiu-se obter o óleo autêntico de chia extraído através das sementes de *Salvia hispanica* por prensagem mecânica, que apesar do baixo rendimento, forneceu quantidade suficiente para o tratamento térmico.

Os óleos de chia, linhaça, peixe, alho e prímula apresentaram comportamento semelhante, perdendo a quantidade de óleos insaturados com o decorrer do tempo em temperatura de fritura, mostrando-se óleos estáveis em temperaturas baixas e moderadas.

O óleo de chia mostrou-se estável no teste de Shaal, mantendo seu perfil graxo e não apresentando compostos oriundos da oxidação secundária após os testes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AURSAND, M., Rainuzzo, J. R., & Grasladen, H. (1993). Quantitative high-resolution  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance of  $\omega$ -3 fatty acids from white muscle of atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70, 971-981.
- CIAXSON, A. W. D., Hawkes, G. E., Richardson, D. P., Naughton, D. P., Haywood, R. M. (1994). Generation of lipid peroxidation products in culinary oils and fats during episodes of thermal stressing: a high field  $^1\text{H}$  NMR study. *FEBS Letters*, 335, 81-90.
- FRANKEL, E.N. Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, v.19, n.1/2, p.1-22, 1980.
- FRANKEL, E.N. Review: recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.54, n.4, p.495-511, 1991.
- FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W. Improving the oxidative stability of polyunsaturated vegetable oils by blending with high oleic sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.71, n.3, p.255-259, 1994.
- MARTINEZ, F. P. Estudo do Óleo de Chia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) e Cromatografia Gasosa (CG). 2014. 62 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Rio de Janeiro, 2014.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. *Food chemistry*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p.176.
- GUILLÉN, M., RUIZ, A. High Resolution  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance in the Study of Edible Oils and Fats. *Trends in Food Science & Technology* 12(9): 328-338. 2001.
- GUILLÉN, M., RUIZ, A. Rapid Simultaneous Determination by Proton NMR of Unsaturation and Composition of Acyl Groups in Vegetable Oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105(11): 688-696. 2003.
- HAUMANN, B.F. Health implications of lipid oxidation. *Inform*, v.4, n.7, p.800-810, 1993.
- HAYWOOD, R. M., Claxon, W. D., Hawkes, G. E., Richardson, D. P., Naughton, D. P., Coumbarides, G., Hawkes, J., Lynch, E. J., & Grootveld, M. C. (1995). Detection of Aldehydes and Their Conjugated Hydroperoxydiene Precursors in Thermally-stressed Culinary Oils and Fats: Investigations Using High Resolution Proton NMR Spectroscopy. *Free Radical Research*, 22, 441-482.
- HEATON, T., Fisher, J., Forth, J. P. (2012). Waste Rapeseed Oil Used as a Binder for Masonry Units: NMR Spectroscopic Analysis. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89, 1101-1111.
- KNOTHE, G., Kenar, J. A. 2004. Determination of the Fatty Acid Profile by  $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106: 88-96. 2004.
- KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*. v. 12, p.99-107, 2001.
- MORAES, F. P. e Colla L. M. / *Revista Eletrônica de Farmácia* Vol 3 (2), 99-112, 2006.

- REDA, S. Y., Carneiro, P. I. B.; Carneiro, E. B. B. B. 2006. H-1 NMR Characterization of Seed Oils from Rangpur Lime (*Citrus limonia*) and Sicilian Lemon (*Citrus limon*). *Annals of Magnetic Resonance*.
- SMOUSE, T.H. Factors affecting oil quality and stability. In: WARNER, K.; ESKIN, N.A.M. *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods*. Champaign, IL: AOCS, 1995. p.17.
- SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes Funcionais nos Alimentos. *Boletim da SBCTA*. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.
- V.Y. Ixtaina et al. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011) 166–174.
- YAMADA, K., Sato-Mito N, Nagata J, et al. Health claim evidence requirements in Japan. *Journal of Nutrition* 138( 2008) 1192S-8S.
- Ying Zhang, Lei Yang, Yuqiang Zu, Xiaoqiang Chen, Fuji Wang, Fang Liu. Oxidative Stability of Sunflower Oil Supplemented With Carnosic Acid Compared With Synthetic Antioxidants During Accelerated Storage. *Food Chemistry* 118 (2010) 656-662.
- WIJS, J.J.A. The Wijs Method as the Standard for Iodine Absorption. ***Analyst*** 54(634): 12-